



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**BIOFORTIFICAÇÃO DE FOLATO EM ALFACE (*Lactuca sativa* L. cv. Verônica)**

**VIA ENGENHARIA METABÓLICA**

**HEITOR VICENTE ROSA**

**Brasília-DF**

**Julho/2013**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**BIOFORTIFICAÇÃO DE FOLATO EM ALFACE (*Lactuca sativa* L. cv. Verônica)**

**VIA ENGENHARIA METABÓLICA**

**HEITOR VICENTE ROSA**

Monografia apresentada a Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como requisito da disciplina de Estágio Supervisionado para a obtenção do título de Graduação em Engenharia Agrônoma.

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Carmona**

**Co-orientador: Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão**

**Brasília-DF**

**Julho/2013**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**BIOFORTIFICAÇÃO DE FOLATO EM ALFACE (*Lactuca sativa* L. cv. Verônica)**  
**VIA ENGENHARIA METABÓLICA**

Monografia de autoria de **HEITOR VICENTE ROSA**, apresentada a Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, intitulada: “BIOFORTIFICAÇÃO DE FOLATO EM ALFACE (*Lactuca sativa* L. cv. Verônica) VIA ENGENHARIA METABÓLICA”, como requisito da disciplina de Estágio Supervisionado para a obtenção do título de Graduação em Engenharia Agrônômica.

Apresentada e aprovada em **12/07/2013**, pela banca examinadora constituída por:

---

**Eng. Agrônomo Ricardo Carmona, Dr.** (Orientador)  
Universidade de Brasília – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

---

**Eng. Agrônomo Francisco J. L. Aragão, Dr.** (Co-Orientador)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Laboratório de Engenharia Genética

---

**Biomédica Franciele Roberta Maldaner, Dra.** (Examinador)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Laboratório de Engenharia Genética

**Brasília-DF**

**Julho/2013**

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO – FAV/UnB**

Rosa, Heitor Vicente

Biofortificação de folato em alface (*Lactuca sativa* L. cv. Verônica) via engenharia metabólica / Heitor Vicente Rosa, 2013.  
44 p. : il.

Monografia (Graduação) – Universidade de Brasília, 2013.  
Orientador: Ricardo Carmona; Co-orientador: Francisco José Lima Aragão.

1. Biofortificação 2. Folato 3. Alface 4. *Lactuca sativa* L. 5. Engenharia metabólica  
I. Aragão, Francisco J. L. II. Título.

**REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

ROSA, H. V. **Biofortificação de folato em alface (*Lactuca sativa* L. cv. Verônica) via engenharia metabólica.** Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília; 2013. 44 p. Monografia.

**CESSÃO DE DIREITOS**

**NOME DO AUTOR:** HEITOR VICENTE ROSA

**NOME DA MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO (GRADUAÇÃO):**

BIOFORTIFICAÇÃO DE FOLATO EM ALFACE (*Lactuca sativa* L. cv. Verônica) VIA ENGENHARIA METABÓLICA.

**Grau:** 3º

**Ano:** 2013

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva os outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

---

HEITOR VICENTE ROSA

## DECICATÓRIA

Ao meu tio Geovane,  
grande conhecedor da terra.

## AGRADECIMENTOS

À minha família.  
Ao Dr. Francisco J L Aragão,  
que alimentou meus sonhos durante esses anos que estive ausente de casa.  
Ao Dr. Ricardo Carmona e a Dra. Franciele Maldaner.  
A Deus, Nossa Senhora e Santo Expedito,  
que asseguram minha fé.

“Tendo amor e saúde da vida eu não reclamo,  
eu amo a vida que levo e levo a vida que amo.”

Tião Carreiro

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA  
AGRADECIMENTOS  
SÚMARIO

RESUMO	09
1. REFERÊNCIAL TEÓRICO	10
1.1. FOLATO	10
1.1.1. Breve histórico	10
1.1.2. Estrutura e funções	10
1.1.3. Metabolismo em plantas	11
1.1.3.1. Biossíntese	11
1.1.3.2. Compartimentação celular e transporte	14
1.1.3.3. Distribuição em órgãos e tecidos	15
1.1.3.4. Controle da homeostase	17
1.1.4. Fisiologia em saúde humana e doenças	19
1.1.4.1. Manifestações metabólicas e clínicas de deficiência	19
1.1.4.2. Fontes alimentares e recomendações de consumo	21
1.2. A CULTURA DA ALFACE	23
1.2.1. A planta	23
1.2.2. Composição nutricional	24
1.2.3. Importância econômica	24
1.2.4. Melhoramento genético	25
1.3. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DA ALFACE	26
1.3.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> como vetor de transformação de plantas	26
1.4. TESTE RÁPIDO DE IMUNOCROMATOGRAFIA DE FLUXO LATERAL	27
1.4.1. Strip Test® GMO TraitCheck™ Leaf (gene <i>bar</i> – PAT)	27
1.5. QUANTIFICAÇÃO DE FOLATO PELO MÉTODO MICROBIOLÓGICO	27
1.5.1. Kit VitaFast® Folic Acid – AOAC ifp	27
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Construção dos vetores de expressão pCatgchl e pCatadcs	29
3.2. Transformação genética de alface mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
3.2.1. Materiais	30
3.2.1.1. Estirpe de <i>A. tumefaciens</i> , plasmídeo e genes marcadores	30
3.2.1.2. Meio de cultura para <i>A. tumefaciens</i>	30

3.2.1.3. Cultura de tecidos	31
3.2.2. Métodos	31
3.2.2.1. Germinação de sementes	31
3.2.2.2. Preparação da <i>Agrobacterium</i>	32
3.2.2.3. Preparação dos explantes	32
3.2.2.4. Inóculo da <i>Agrobacterium</i>	32
3.2.2.5. Inoculação dos explantes e co-cultivação	32
3.2.2.6. Manutenção das culturas e regeneração de brotos	32
3.2.2.7. Transferência das plantas para o solo e aclimação	33
3.3. Análises para confirmação da inserção dos transgenes	33
3.3.1. Imunocromatografia de fluxo lateral – IFL (Strip Test® GMO TraitCheck™)	33
3.3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	34
3.4. Quantificação de folato pelo método microbiológico (Kit VitaFast® Folic Acid)	34
4. RESULTADOS	35
5. CONCLUSÕES	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38



## RESUMO

A deficiência de folato ou vitamina B<sub>9</sub> é uma das deficiências vitamínicas mais comuns em todo o mundo, estando associada a graves problemas de saúde. Fatores como: dieta limitada, absorção deficiente e tratamentos farmacológicos interferem na biodisponibilidade de folato, principalmente entre as mulheres grávidas, nas quais a deficiência de folato pode causar desde aborto espontâneo à defeitos na formação do tubo neural (DTN) no feto. No Brasil, o folato possui um papel estabelecido na prevenção de doenças cardiovasculares, certos tipos de câncer, depressão e distúrbios neuropsiquiátricos. Neste contexto, a biofortificação de folato em alface via engenharia metabólica é uma alternativa complementar para enfrentar a deficiência de folato. A alface (*Lactuca sativa* L. cv. Verônica) foi escolhida para ter o seu teor de folato aumentado por ser a hortaliça folhosa de maior importância global, consumida “*in natura*”. Em experimentos independentes, foram manipuladas duas vias metabólicas precursoras da biossíntese de folato: (1) a via das pterinas (citoplasmática), pela superexpressão do gene que codifica para a enzima *GTP ciclohidrolase I* (*gchI*) e (2) a via do ácido *p*-aminobenzóico (cloroplasmática) pela superexpressão do gene que codifica para a enzima *aminodeoxicorismato sintase* (*adcs*). Ambos os transgenes *AtgchI* e *Atadcs* foram obtidos de *Arabidopsis thaliana*. Foram realizados 6 experimentos de transformação genética de alface mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para obtenção de linhagens geneticamente modificadas (GM) expressando os cassetes T-DNA.*AtgchI* e T-DNA.*Atadcs*, ambos contendo como marcador o gene *bar* (codifica a enzima *fosfinotricina-N-acetiltransferase* - *PAT*). Foram confirmadas 2 linhagens GM para o transgene *AtgchI* e 3 linhagens GM para o transgene *Atadcs* após análise por PCR e constatado nas 5 linhagens GM a expressão do gene *bar* (*PAT*) por Imunocromatografia de fluxo lateral (Strip Test<sup>®</sup> GMO TraitCheck<sup>™</sup>). Essas linhagens foram autofecundadas, e as progênes (T<sub>1</sub>) apresentaram padrão mendeliano de segregação (3:1) para os transgenes e para o marcador. A quantificação de folato total nas folhas de alfaces GM (T<sub>1</sub>) mostraram aumento de 15 e 7 vezes mais folato total pela superexpressão dos transgenes *AtgchI* e *Atadcs*, respectivamente, quando comparadas à folhas de alface não transgênicas.

Palavras-chave: biofortificação, folato, alface, *Lactuca sativa* L., engenharia metabólica.

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

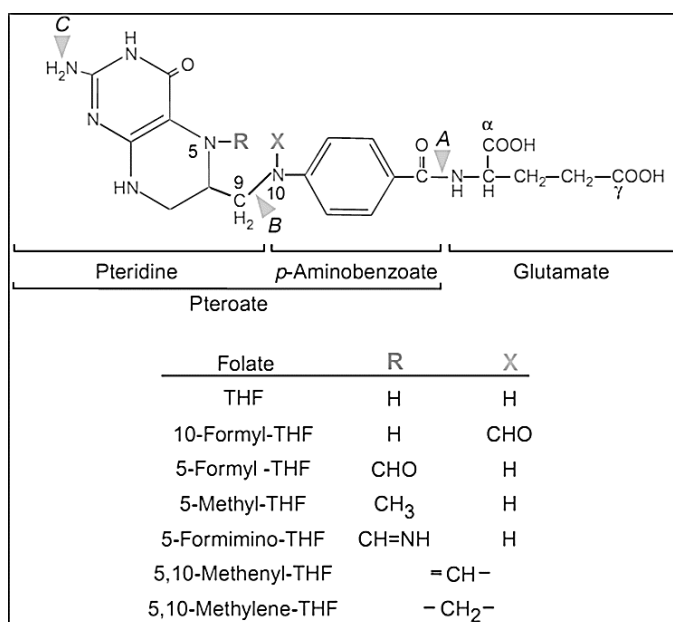
### 1.1. FOLATO

#### 1.1.1. Breve histórico

Em 1931, a Dra. Lucy Wills demonstrou que o extrato de levedura foi eficaz contra a anemia macrocítica tropical frequentemente observada durante a gravidez tardia na Índia (WILLS, L., 1931). Embora ainda tão desconhecido, o fator crítico envolvido era o folato. Vários pesquisadores contribuíram para o isolamento desta vitamina e a elucidação da sua estrutura (STOKSTAD, E.L.R., 1979). O nome folato é derivado do latim-*folium* (folha).

#### 1.1.2. Estrutura e funções

Folato(s) ou vitamina B<sub>9</sub> é um termo genérico para tetrahydrofolato (THF) e seus derivados. Quimicamente, os folatos são moléculas tripartidas compostas de uma pterina, um ácido *p*-aminobenzoico (*p*ABA) e resíduos de glutamatos  $\gamma$ -ligado (Fig. 1).



**Figura 1.** Estrutura de THF e seus derivados.

A partir desta arquitetura química, existe uma grande diversidade de espécies relacionadas resultante do estado de oxidação do anel de pterina, das diferentes substituições

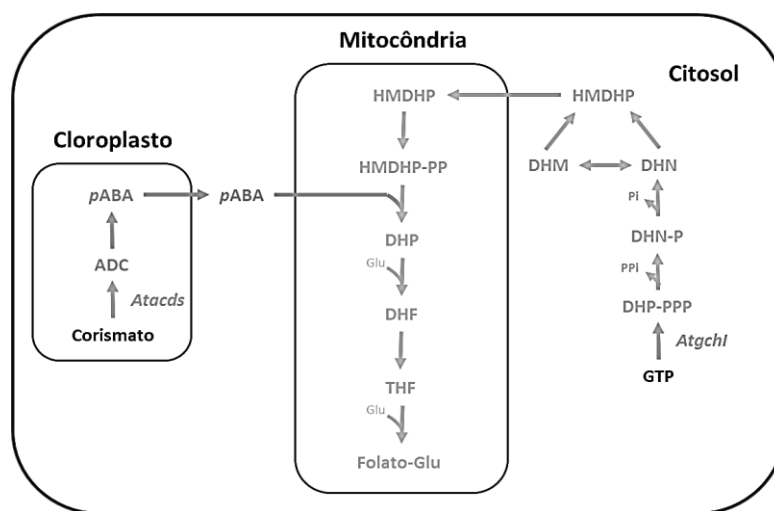
de unidades de um carbono sobre as partes de pterina e/ou pABA, e/ou do comprimento da cadeia lateral de glutamatos (RAVANEL, S., 2011). Folato(s) celulares ocorrem como dihidrofolato ou tetrahidrofolato derivados de folatos naturais e de ácido fólico (sintético), a forma mais oxidada, não existente na natureza de forma significativa. A sua ocorrência é dependente da síntese comercial para uso em suplementos e na fortificação de alimentos. Apenas THF tem atividade de coenzima no metabolismo de 1C aceitando e doando unidades de 1C. Esses grupos de um carbono variam no estado de oxidação de formil (mais oxidado) para metil (mais reduzido) e estão ligados no N<sub>5</sub> da porção de pterina, N<sub>10</sub> da porção de pABA ou como uma ponte entre os dois (Fig. 1). Além disso, folato(s) que ocorrem naturalmente são predominantemente poliglutamatos e, portanto, são denominados folilpoliglutamatos. Em todos os organismos, a poliglutaminação é conhecida por ser essencial para três funções fisiológicas (SHANE, 1989). Primeiro, folilpoliglutamatos são as coenzimas preferidas para a maior parte das enzimas envolvidas no metabolismo de um carbono. Em segundo lugar, a cadeia aumenta a estabilidade dos folatos por favorecer a ligação às proteínas, sendo menos sensíveis à degradação oxidativa (RÉBEILLÉ et al., 1994). Em terceiro lugar, poliglutaminação é o principal meio pelo qual os folato(s) são mantidos dentro das células e compartimentos subcelulares.

### 1.1.3. Metabolismo em plantas

#### 1.1.3.1. Biossíntese

Plantas, fungos, a maioria dos micróbios e parasitas do filo *Apicomplexa* têm a capacidade de sintetizar THF *de novo* (RÉBEILLÉ et al., 2006). Os seres humanos e os animais em geral não podem sintetizar folatos *de novo* e, portanto, dependem completamente de fontes dietéticas. A via biossintética de THF é quase idêntica em todos os organismos autotróficos.

A via de biossíntese de THF está completamente elucidada (Fig. 2) (RAVANEL, S., 2011). As enzimas de plantas possuem propriedades estruturais e bioquímicas únicas e apresentam uma organização espacial complexa, em que participam três compartimentos subcelulares. As partes pterina e *p*ABA de THF são primeiramente sintetizadas em vias separadas, provenientes de corismato (cloroplastos) e GTP (citósol), respectivamente. Essas partes são então importadas e montadas nas mitocôndrias, em conjunto com o glutamato, para a produção de dihidrofolato, que depois é convertido para tetrahidrofolato em duas etapas.



**Figura 2.** Biossíntese de THF. As enzimas superexpressadas nas vias precursoras da síntese de folato (vermelho): (*Atadcs*) aminodeoxicorismato sintase (*A. thaliana*); *GTP* ciclohídrase I (*A. thaliana*).

Ácido *para*-aminobenzóico (*p*ABA) é sintetizado a partir de corismato, um produto da via do chiquimato que também está envolvido na síntese de aminoácidos aromáticos e seus derivados. A síntese de *p*ABA a partir de corismato ocorre em duas etapas localizadas nos cloroplastos (Fig. 2). Primeiro, a aminação de corismato produz 4-amino-4-deoxicorismato (ADC), esta reação é catalisada pela enzima *aminodeoxicorismato sintase* (*ADC sintase*), que é uma interação dos domínios de PabA e PabB (BASSET et al., 2004). Cada domínio pode operar de forma independente, mas o acoplamento aumenta a eficiência catalítica de cada reação. A aminação é o passo limitante da atividade da enzima bifuncional (*ADC sintase*) e é inibida por “feedback” de ADC (CAMARA et al., 2011). Isto sugere que *ADC sintase* de planta

poderia ser um potencial passo regulador para controlar o fluxo de particionamento de corismato para sínteses de folato, triptofano, tirosina e fenilalanina. O segundo passo da síntese de *pABA* compreende a eliminação de piruvato e a aromatização do anel de ADC, esta reação é catalisada pela enzima *aminodeoxycorismato liase (ADCL)*, responsável pela conversão de ADC em *pABA* (BASSET et al., 2002).

Hidroximetildihidropterina (pterina) é sintetizado a partir de GTP, um produto da via de biossíntese *de novo* de guanosina trifosfato que também está envolvido no transporte de energia, na forma de potencial de transferência de grupos fosfato, assim como o ATP (BASSET et al., 2002). A conversão de GTP em hidroximetildihidropterina (HMDP) é um processo de quatro passos, que é presumivelmente citosólico, enquanto nenhuma das enzimas envolvidas possuem sinais óbvios de segmentação (Fig. 3). A primeira reação é catalisada pela *GTP ciclodrolase I (GTPCHI)* para formar 7,8-dihidroneopterina trifosfato (DHN-PPP). *GTPCHI* está presente nos organismos que sintetizam folatos e em mamíferos, onde está envolvida na síntese de outras pterinas. Dado que *GTPCHI* catalisa o primeiro passo da síntese de derivados de pterina, a enzima é considerada por controlar fluxos para esta via (BASSET et al., 2004). A cadeia lateral de trifosfato de DHN-PPP é posteriormente removida em duas etapas para a produção de 7,8-dihidroneopterina (DHN). Primeiro, DHN-PPP pirofosfatase cliva especificamente DHN-PPP para produzir DHN-P (KLAUS et al., 2005). Em segundo lugar, o fosfato remanescente é clivado em DHN pela ação de uma fosfatase. Esta enzima não foi ainda identificada em plantas. O último passo da via das pterinas é catalisado pela DHN aldolase que cliva a cadeia lateral trihidroxipropil de DHN para originar hidroximetildihidropterina (GOYER et al., 2004).

A combinação de hidroximetildihidropterina, *pABA* e glutamato para produzir dihidrofolato envolve três reações que estão localizadas dentro da mitocôndria (Fig. 2). Primeiro, hidroximetildihidropterina é ativada para a sua forma pirofosforilada através da operação da *hidroximetildihidropterina pirofosfoquinase (HPPK)*. O segundo passo, 7,8-

dihidropteroato é produzido pela condensação de *p*ABA com a pterina ativada numa reação catalisada pela *dihidropteroato sintase* (*DHPS*). Nas plantas, estas duas reações são catalisadas por um enzima bifuncional denominada HPPK-DHPS (RÉBEILLÉ et al., 1997). O terceiro passo é a fixação dependente de ATP e de glutamato no radical carboxilo do *p*ABA para formar dihidrofolato. Ele é catalisado por uma dihidrofolato sintase (*DHFS*) (RAVANEL et al., 2001), uma enzima que é essencial para o desenvolvimento das plantas devido a mutação neste gene ser letal em embrião de *Arabidopsis*.

Antes de entrar no metabolismo de 1C, dihidrofolato é reduzido para THF e poliglutamilado pela operação de duas enzimas que estão presentes em todos os reinos. Dihidrofolato é reduzido a THF-Glu por DHFR utilizando NADPH como doador de elétrons (fig. 3) (COSSINS & CHEN, 1997; SCHNELL et al., 2004).

#### 1.1.3.2. Compartimentação celular e transporte de folatos

Em plantas os folatos estão presentes em diferentes compartimentos celulares. A distribuição geral de folatos totais em folhas de ervilha é de aproximadamente 40% nas mitocôndrias, 10% em cloroplastos, 20% em vacúolos e 30% no citosol (CHAN & COSSINS, 2003; JABRIN et al., 2003; ORSOMANDO et al., 2005).

Nas organelas, os folatos são quase exclusivamente poliglutamatos, com as espécies penta- e hexa-glutamato sendo as mais abundantes, mas os perfis de folatos são diferentes. Folatos mitocondriais são predominantemente na forma 5-formil-THF, o qual não está diretamente envolvido nas reações de transferência de um carbono e THF não substituído, o que provavelmente resulta da síntese *de novo* (CHAN & COSSINS, 2003; ORSOMANDO et al., 2005).

Os cloroplastos são ricos em 10-formil-THF e 5,10-metenil-THF e contêm uma quantidade significativa de 5-metil-THF (ORSOMANDO et al., 2005), em conformidade com a atividade metabólica destas organelas em relação a síntese de purinas e metionina.

Em folhas de ervilha e nas raízes de beterraba vermelha, vacúolos contêm quase que exclusivamente 5-metil-THF, dos quais 50-75% são poliglutamatos (ORSOMANDO et al., 2005). Como metionina sintase está ausente nos vacúolos, estes dados sugerem que o 5-metil-THF é uma forma potencial de armazenamento para folato nas células vegetais, uma situação que é concebível que este derivado é bastante estável a degradação oxidativa e é facilmente convertido a outros folatos.

Na planta a via biosintética de folato é dividida entre o citosol, cloroplastos e mitocôndrias. Esta organização complexa, juntamente com a presença de folatos em diferentes compartimentos subcelulares, sugere um tráfego sofisticado de coenzimas de folatos e seus intermediários biossintéticos entre as organelas através do citosol. Estas etapas de transporte intracelular incluem captação de pteridina do citosol para dentro da mitocôndria, exportação de pABA do plastídio e importação para dentro da mitocôndria, liberação de folatos da mitocôndria e a captação em plastídios e influxo e efluxo de folatos nos vacúolos.

#### 1.1.3.3. Distribuição de folatos em órgãos e tecidos vegetais

Como detalhado acima, folatos estão presentes no citosol, mitocôndria, cloroplastos e vacúolos de células vegetais, onde os THF-derivados não são distribuídos igualmente. Ao considerar os órgãos ou tecidos da planta inteira, os folatos são em grande parte dominados por derivados de metil (45–65%) e de formil (30–55%) (COSSINS, 2000). Em sementes e tecidos quiescentes, 5-formil-THF poderia agir como uma forma de armazenamento de folatos, este derivado sendo o folato natural mais estável.

O conteúdo de folato total varia muito de uma planta para outra e com a natureza do órgão ou tecido. Além disso, o “*pool*” de folato varia principalmente durante o curso do desenvolvimento da planta, sugerindo que a síntese e a degradação de folato é fortemente controlada e modulada em função das necessidades metabólicas (BASSET et al., 2004; COSSINS, 2000; JABRIN et al., 2003).

No desenvolvimento de plântulas de ervilha, verificou-se que os tecidos com uma reduzida atividade metabólica, como cotilédones, raízes e caules, contêm uma quantidade limitada de folatos (JABRIN et al., 2003; RÉBEILLÉ et al., 2006). Da mesma forma, frutos de tomate têm baixo teor de folatos e o “*pool*” diminui gradualmente durante a maturação (BASSET et al., 2004). Em contraste, a síntese e a acumulação de folato é importante quando tecidos dividem rapidamente. Em ervilha, o processo de germinação, que se correlaciona com a transição de um estado quiescente para um estado metabólico ativo e uma retomada da atividade do ciclo celular, é acompanhado por um aumento em coenzimas de folato em embriões (JABRIN et al., 2003). Além disso, tecidos meristemáticos do ápice da raiz contém cinco vezes mais folato do que a raiz madura e culturas de suspensão de células de *Arabidopsis*, que têm um tempo de geração curto, mostram o conteúdo de folato muito alto (LOIZEAU et al., 2007, 2008).

Estas observações sugerem que a proliferação de tecidos têm uma alta capacidade de sintetizar e acumular as coenzimas de folatos para atender a demanda para a síntese de nucleotídeos e alta atividade do metabolismo de 1C. Folhas verdes maduras também são caracterizadas por um elevado teor de folato que é desencadeado pela aquisição da fotossíntese e, portanto, está relacionada com a luz (JABRIN et al., 2003). A relação entre a acumulação de folato nas folhas e a fotossíntese não está ainda totalmente compreendida. Fotorrespiração envolve duas enzimas dependentes de folatos, GDC e SHMT, que se acumulam no interior da mitocôndria durante o esverdeamento (DOUCE et al., 2001). Parte do folato sintetizado na luz



pode contribuir para o processo fotorrespiratório, mas a maioria do folato acumula-se na fração extraorganelar (citossol mais vacúolos) como derivados de 5-metil-THF. Portanto, é provável que o elevado teor de folato em folhas verdes está associado com uma elevada atividade do ciclo de metil para assegurar uma renovação rápida de AdoMet (RÉBEILLÉ et al., 2006). Esta hipótese é suportada pela tríplice diminuição na síntese de clorofila, que depende de um passo de metilação AdoMet-dependente, em plântulas de ervilha, exibindo uma modesta (~25%) escassez de folatos (VAN WILDER et al., 2009).

#### 1.1.3.4. Controle da homeostase

Como descrito acima, o “*pool*” de folatos varia consideravelmente de maneira dependente do órgão e do desenvolvimento para atender as demandas fisiológicas flutuantes para unidades de 1C. Nessas diferentes situações, a homeostase de folatos deve ser rigidamente controlada através de mecanismos bioquímicos, genéticos e de desenvolvimento. Estes mecanismos devem ocorrer no nível de biossíntese de THF, de geração e interconversão das espécies de folatos, do tráfego intracelular, do catabolismo e de salvamento. Até o momento, esses mecanismos ainda são pouco compreendidos. A caracterização cinética de algumas enzimas envolvidas na síntese de THF, indicou a existência de reguladores por loops de feedback negativo. Assim, *ADC sintase* é inibida por feedback de ADC (CAMARA et al., 2011), enquanto que a atividade de DHPS é controlada por dihidropteroato, dihidrofolato e THF-Glu (MOUILLON et al., 2002). A relevância fisiológica destes circuitos reguladores de feedback é difícil de prever, porque o “*pool*” de intermediários reguladores são presumivelmente muito baixos.

Regulação da síntese de THF a nível do gene foi investigada durante os estágios jovens de desenvolvimento de ervilha e durante os estágios de maturação dos frutos e das sementes. Elevados níveis de expressão dos genes que codificam HPPK-DHPS e DHFR foram

encontradas em órgãos e tecidos de ervilha com níveis elevados de folato, isto é, embriões, ápices da raiz e folhas verdes em desenvolvimento (JABRIN et al., 2003). Além disso, os níveis de expressão de genes que codificam *GTPCHI*, *ADC sintase* e *ADC liase* foram encontrados em declínio durante o amadurecimento de tomate e na maturação das sementes de trigo, estágios de desenvolvimento que são caracterizados por uma diminuição do teor de folato (BASSET et al., 2004). Recentemente, o nível de expressão de todos os genes da síntese de folato foi investigado durante o desenvolvimento do fruto de tomate (WALLER et al., 2010). Com exceção dos genes acima mencionados (*GTPCHI*, *ADC sintase* e *ADC liase*), nenhum dos outros genes envolvidos na síntese de THF seguiu um padrão de expressão semelhante. Juntos, estes estudos indicaram uma regulação no desenvolvimento de uma parte dos genes envolvidos na síntese de THF e sugeriram a ausência de um controle global coordenado de toda a via, ao nível do gene.

Estudos de plantas ou de células de planta em que homeostase de folato tem sido geneticamente ou quimicamente modificada tem fornecido novas perspectivas sobre os mecanismos que regulam o metabolismo de folato. Assim, uma análise de tomates transgênicos superexpressando genes da *GTPCHI* e *ADC sintase* indicou um aumento de duas a oito vezes dos genes a jusante da via de codificação *DHNA*, *ADC liase* e *FPGS* mitocondrial (WALLER et al., 2010). Estes tomates continham até 15 vezes mais folatos do que frutas do tipo selvagem, bem como o aumento dos níveis (> 20 vezes) de pterinas e *pABA* (DIAZ DE LA GARZA et al., 2007). O seguinte controle antecipado da via foi proposto para explicar estes dados: a acumulação de pterinas e ADC poderia ter induzido *DHNA* e *ADC liase*, respectivamente, e a acumulação de folatos, que são menos extensivamente poliglutamatos em linhas transgênicas que nos controles, pode ter induzido *FPGS* mitocondrial (WALLER et al., 2010). Juntos, esses dados ilustram que o controle da homeostase de folato e da dinâmica do metabolismo de um

carbono envolve vários níveis de regulação. Estes mecanismos são ainda pouco conhecidos, e uma visão mais abrangente tem de surgir para ajudar os esforços futuros de biofortificação.

#### 1.1.4. Fisiologia de folatos em saúde humana e doenças

##### 1.1.4.1. Manifestações metabólica e clínica de deficiência

Deficiência de folato é uma das deficiências vitamínicas mais prevalentes em todo o mundo. Ela pode ser devido a vários fatores, incluindo uma dieta limitada, uma absorção prejudicada e tratamentos farmacológicos. Além disso, as mulheres grávidas correm o risco de deficiência de folato porque a gravidez aumenta significativamente a necessidade de folato, especialmente durante o período de rápido crescimento fetal. É geralmente aceito que os níveis de folato abaixo 300-330 nmol/L em eritrócitos são considerados sugestivos de risco e podem ser sintoma de deficiência de folato. Medições das concentrações de homocisteína de plasma também são usadas como um indicador do status de folato. Este critério, no entanto, não é suficiente para estabelecer a deficiência de folato, porque o estado nutricional de vitamina B<sub>12</sub> ou de vitamina B<sub>6</sub>, bem como outros fatores, também podem afetar a concentração de homocisteína (STOVER, 2004). No caso de deficiência de folato, todas as reações no metabolismo de IC serão comprometidas em graus variáveis, levando à alteração dos pools de substratos/produtos que podem ter consequências negativas.

O folato é recentemente uma das vitaminas mais ativamente estudadas na área de nutrição e saúde humana. Isso é principalmente devido ao seu papel estabelecido na prevenção de algumas doenças graves, incluindo defeitos do tubo neural (DTN), como anencefalia e espinha bífida em recém-nascidos, anemia megaloblástica, doenças cardiovasculares, certos tipos de câncer, depressão e distúrbios neuropsiquiátricos em adultos.

Após a deficiência de folato, a re-metilação ineficiente de homocisteína em metionina está associada com o aumento dos níveis de homocisteína no sangue. Evidências epidemiológicas

indicam que a elevada concentração de homocisteína plasmática ( $> 14 \mu\text{mol/L}$ ) é um fator de risco para doença cardiovascular e acidente vascular cerebral (STOVER, 2004). Aumento do teor de homocisteína plasmática também pode ser um fator de risco para distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo a doença de Alzheimer e de Parkinson (MATTSON & SHEA, 2003). O comprometimento da síntese de metionina sobre a deficiência de folato também resulta em quantidades insuficientes de AdoMet disponíveis para reações de metilação. Estes são necessários para a biossíntese de muitos produtos importantes e para a metilação do DNA e de histonas, que são importantes determinantes epigenéticos na expressão gênica. A hipometilação do DNA é um evento precoce e consistente na carcinogênese e está associada com a instabilidade genômica e um aumento de mutações (CHOI E MASON, 2000). Outra consequência da deficiência de folato é uma diminuição da síntese de dTMP devido à limitação da oferta de 5,10-metileno-THF para TS. Modificação dos resultados de equilíbrio de dUMP/dTMP intracelulares resulta em uma maior incorporação de dUTP no DNA, o que gera mutações pontuais, quebras simples e dupla do DNA e quebra cromossômica em última instância. Estes eventos relacionados com a estrutura de DNA, a estabilidade e a regulação transcricional são propensos a subjacência de toda uma gama de câncer. Em particular, uma relação entre o estado de folato e carcinoma colo-retal, colo do útero e de mama tem sido observado em vários estudos (CHOI E MASON, 2000).

Além de seu papel na síntese dTMP, o folato também oferece suporte a síntese de ácido nucléico, através da biogênese do anel purina. Assim, há comprometimento geral da divisão celular com deficiência de folato, o que é mais evidente nos tecidos com renovação rápida, tal como o sistema hematopoiético. O tipo específico de anemia associada com a deficiência de folato (anemia megaloblástica) é caracterizada pela acumulação de células da medula, células grandes, anormais, nucleadas precursoras de eritrócitos. Finalmente, há um consenso geral de que a redução de folato materno está associado a um aumento do risco de DTN (GEISEL, 2003).

Dois dos graves defeitos congênitos mais comuns do cérebro e da coluna vertebral são a espinha bífida e a anencefalia. Embora o mecanismo pelo qual a ingestão adequada de folato reduz o risco durante a fase crucial de desenvolvimento do tubo neural embrionária seja desconhecida, as campanhas de saúde pública em muitos países recomendam suplementação periconcepcional de folato sintético (ácido fólico) para reduzir o risco de DTNs.

Alguns dados demonstram as consequências da deficiência de folato no mundo, está provoca cerca de 300.000 DTN por ano, e é responsável por 10% da mortalidade de adultos com doenças do coração (UNICEF, 2004). Além disso, a deficiência de folato é a principal causa de anemia em, pelo menos, 10 milhões de mulheres grávidas no mundo (RUSH, D., 2000). Alguns países desenvolvidos adotam um programa de fortificação com ácido fólico sintético, no entanto, esse está ausente em países em desenvolvimento por causa dos custos recorrentes, das desigualdades de distribuição, e da falta de um sistema de alimento industrializado (DELLAPENNA, D., 1999). Além disso, surgiram preocupações sobre as doenças que ameaçam a vida humana por causa da exposição crônica ao ácido fólico sintético (LUCOCK, M., 2005).

#### 1.1.4.2. Fontes alimentares de folatos e recomendações de consumo

O Conselho de Alimentos e Nutrição da Academia Nacional do Instituto de Ciência dos EUA analisou os dados de ingestão de folato, status e saúde para todos os grupos etários (FOOD AND NUTRITIONAL BOARD, 1998). Nesse sentido, as exigências de folato foram definidas como as doses necessárias para a manutenção das reações normais de transferência de 1C, tal como estimado pela medida da concentração de folato nas células vermelhas do sangue (BAILEY E GREGORY, 1999). Esta avaliação exaustiva levou a estimativa de uma necessidade média e uma estimativa posterior das “*Recommended Dietary Allowances*” (RDAs). Esta definição está de acordo com o consumo dos nutrientes recomendados editada

pela Food and Agriculture Organization (FAO) das Nações Unidas e da Organização Mundial da Saúde. Para homens e mulheres adultos > 19 anos de idade, a RDA de folato é de 400 µg de folato equivalentes na dieta (DFE)/dia. DFE é definida como a quantidade de folatos de alimentos que ocorrem naturalmente mais 1,7 vezes a quantidade de folato sintético adicionado na dieta, o folato sintético está sendo considerado 1,7 vezes mais biodisponível do que folatos naturais (BAILEY E GREGORY, 1999). Para mulheres grávidas, a RDA é de 600 µg para lidar com o aumento das exigências de folato, que estão associadas com a rápida taxa de crescimento celular materno e fetal durante a gravidez e o desenvolvimento.

Conteúdo de folato foram determinados para uma ampla variedade de alimentos, incluindo alimentos crus, processados e preparados. Com exceção do fígado, que é o órgão de maior armazenamento de folato, carne, aves e produtos da pesca geralmente contêm pequena quantidade de folato (5-60 µg/100 g de porção). Além disso, o teor de folato diário em produtos é geralmente baixo, por exemplo, o folato total no leite de vaca, está na faixa de 5-10 µg/100 g. Muitos alimentos derivados de plantas são particularmente ricos em folato, que incluem vegetais verdes folhosos, legumes e algumas frutas. Como mencionado acima, a quantidade de folato em alimentos vegetais depende principalmente da espécie e a natureza do tecido. A contribuição das diferentes fontes de alimentos para a ingestão de folato dietético total é influenciada por vários parâmetros, incluindo a biodisponibilidade, a estabilidade durante o armazenamento, processamento, culinária e hábitos alimentares (SCOTT et al., 2000). Vários inquéritos alimentares na América do Norte e países da Europa Ocidental indicam que alimentos de origem vegetal são, de longe, os principais contribuintes para a ingestão de folato em adultos. Assim, cerca de 35-40% do folato dietético é fornecido por vegetais (incluindo batatas) e frutas, e cerca de um terço por produtos à base de cereais/grãos (SCOTT et al., 2000). Estes tipos de pesquisas também indicaram que a ingestão de folato típico são de qualidade inferior nos países ricos. Por exemplo, a média de ingestão de folato total variou entre adultos

168-326µg/dia em vários países europeus, isto é, 20 a 60% inferior ao nível recomendado de 400µg/dia (DE BRI et al., 1997). Como consequência, a “*Food and Drug Administration*” (FAD), publicaram regulamentos que exigem a adição de folato sintético para alimentos derivados de cereais (fortificação). A principal motivação por trás da fortificação obrigatória era para diminuir a ocorrência de DTN. Em vigor desde 1998, a fortificação obrigatória de folato melhorou claramente o status de folato com o aumento dos níveis de folato por dois a três vezes no soro e em 38% em células vermelhas do sangue, e uma diminuição na concentração total de homocisteína em 7%. Mais importante ainda, a incidência de DTN foi reduzida em 20-53%, desde o início da fortificação na América do Norte (DE WALS et al, 2007, EICHHOLZER et al, 2006). Apesar de considerar esses efeitos benéficos, a fortificação de folato permanece um assunto controverso importante na União Europeia que a ingestão de ácido fólico pode mascarar o diagnóstico de deficiência de vitamina B<sub>12</sub>, principalmente em pessoas idosas, permitindo complicações neurológicas progredirem sem diagnóstico.

## 1.2. A CULTURA DA ALFACE

### 1.2.1. A planta

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta herbácea, pertencente à maior família dicotiledônea do reino vegetal, a Asteraceae, gênero *Lactuca* (RYDER, 1999).

Originária da região do Mediterrâneo, esta espécie já era utilizada como planta medicinal há 4.500 a.C., e como hortaliça é registrada a sua utilização desde 2.500 a.C. (DE VRIES, 1997). A planta foi trazida para o Brasil pelos Portugueses (RYDER 1999).

A planta é classificada pela morfologia das folhas, e pelo fato de se reunirem ou não formando uma cabeça. Assim, obtêm-se seis grupos ou tipos diferenciados reconhecidos pelo Código Internacional de Nomenclatura de Plantas Cultivadas, nomeadamente: (1) Repolhuda-Crespa, (2) Repolhuda-Manteiga, (3) Solta-Lisa, (4) Solta-Crespa, (5) Mimosa, e (6) Romana.

A cultivar Verônica (Tipo Crespa), apresenta folhas bem consistentes, crespas e soltas, não formando cabeça. (FILGUEIRA, 2008).

#### 1.2.2. Importância econômica

Alface é cultivada em muitos países do mundo, particularmente na América do Norte, Europa Ocidental, na bacia do Mediterrâneo, Austrália e partes da Ásia (RYDER, 1999). As principais áreas de produção e consumo de alface são os Estados Unidos e a Europa. Nos Estados Unidos, mais de  $3,18 \times 10^9$  ton. são colhidas a cada ano, com excesso de 70% da produção dos Estados Unidos sendo destinada para exportação (RYDER, 1999). Itália, Espanha, França, Holanda e Reino Unido são os principais produtores da Europa. Outras regiões de cultivo incluem Canadá, norte do México, América do Sul, África do Sul, Oriente Médio, Japão, China e sudeste da Austrália. Globalmente,  $24 \times 10^6$  ton. foram produzidas em 2011 (FAOSTAT, 2013). O mercado de alface tem aumentado nos últimos vinte anos, acompanhado, em alguns casos por uma alteração na gama de cultivares. Sendo cultivada, especialmente para processados de salada mista, em “fastfood” (RYDER, 2002).

#### 1.2.3. Composição nutricional

A alface é um alimento básico no mundo, especialmente no Brasil. O termo alimento básico é utilizado no sentido de que ela é consumida regularmente, por um grande número de pessoas, em todas as linhas étnicas e de classe (RYDER, 2002).

A alface é consumida em grande volume em relação a muitos outros vegetais com maior teor de nutrientes. A contribuição real da alface para a dieta humana é consideravelmente mais elevada do que o teor por unidade de peso sugerido (STEVENS, 1974). Em todo o caso, as folhas hortaliças são importantes contribuintes de vitaminas e minerais, tais como as vitaminas A, B e C, cálcio e potássio (DE VRIES, 1997).



Há muitas fontes naturais de folato em nossa dieta, como frutas, vegetais de folhas verdes, como espinafre, brócolis e alface, ou seja, grande parte da suplementação humana de folato provém de recursos vegetais (DE LA GARZA, 2004). Entretanto, os folatos estão presentes em pequenas concentrações em plantas (tipicamente  $\leq 5$  nmol de peso fresco). Segundo Johansson (2007), a quantidade de folato total presente em folhas de alface variam entre 30 e 198 microgramas por 100 gramas de peso fresco.

#### 1.2.4. Melhoramento genético

A seleção e a domesticação de espécies selvagens de *Lactuca*, resultou em um decréscimo no conteúdo de látex e de sabor amargo, a aquisição de um hábito roseta com perda de espinhos, uma fase vegetativa prolongada com a formação da cabeça acompanhada por um aumento da suculência das folhas, e um aumento no tamanho da semente. Os melhoristas tem como objetivo para a alface cultivada incluir modificações da forma da folha e a cor, manipulando a formação de cabeça e atrasando o pendoamento precoce. Outras metas são a introdução da esterilidade masculina e resistências a insetos, herbicidas e doenças.

O melhoramento convencional de alface através de hibridação sexual é dificultado pela estrutura floral e eventos durante a antese, o que normalmente resulta em autofecundação. Os estames são fundidos para formar uma bainha de anteras para o interior da qual recolhe o pólen com a flor aberta. O pólen é derramado sobre o estigma quando este alonga e emerge a partir da bainha de anteras. No entanto, a autofecundação pode ser conseguida, por exemplo, através da remoção da bainha de anteras antes do surgimento do estigmas (RYDER, 1986).

O “pool” de genes para características desejáveis que podem ser adquiridos é restrito, uma vez que alface cultivada é sexualmente compatível apenas com um número limitado de 3 ou mais espécies dentro do gênero *Lactuca*. Os três parentes selvagens, *L. saligna*, *L. visosa* e *L. serriola*, foram explorados mais amplamente em programas de melhoramento. *L. serriola*

cruza livremente com *L. sativa*. Algumas espécies *Lactuca* asiáticos e sul-africanos são doadores de genes potenciais, mas os estudos sobre esses parentes selvagens permanecem limitados (DE VRIES, 1997).

### 1.3. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DA ALFACE

#### 1.3.1. *Agrobacterium tumefaciens* com vetor de transformação de plantas

*Agrobacterium tumefaciens* é uma bactéria fitopatógeno do solo que, por mais de um século, ficou conhecida como o agente etiológico que causa a doença da galha-da-coroa em plantas (ZAMBRYSKI, 1992). *A. tumefaciens* tem como mecanismo de infecção a transferência de um fragmento de DNA do seu genoma para a célula vegetal. Uma vez introduzido no genoma vegetal, esse fragmento de DNA bacteriano (T-DNA ou DNA de transferência) passa a dirigir a síntese de hormônios de crescimento. Forma-se um tumor no local de infecção. Utilizando-se a tecnologia do DNA recombinante, é possível manipular o T-DNA e substituir os genes produtores de tumor por outro gene de interesse. Dessa maneira, a infecção resultará na expressão da característica de interesse, e o tumor não será produzido. A inoculação de células ou pequenos fragmentos de tecidos vegetais com a bactéria, contendo o T-DNA modificado, permitirá que essa célula transformada seja regenerada em uma planta completa, graças ao fenômeno de totipotência, que permite a regeneração de plantas por meio de técnicas de cultura de tecidos *in vitro* (BRASILEIRO & CARNEIRO, 1998). O desenvolvimento de protocolos de regeneração é, portanto, indispensável para a manipulação genética de plantas.

Esta característica exclusiva descoberta a 30 anos, tem sido usada por cientistas de planta como uma ferramenta poderosa para transformar geneticamente plantas, para fins de pesquisa básica e para o desenvolvimento agrícola. As vantagens desse método de transformação são (1) a expressão do gene estável devido à inserção do gene de interesse no

genoma nuclear da planta hospedeira, (2) baixo número de cópias do transgene, e (3) segmentos de DNA de tamanho grande podem ser transferido (CHILTON et al., 1977).

O sistema de infecção de plantas por *Agrobacterium* representa, assim, uma situação única na natureza: a transferência de um elemento genético, o T-DNA, de um organismo procariota para um organismo eucariota superior, com sua subsequente integração e expressão no genoma hospedeiro (BRASILEIRO & LACORTE, 2000).

#### 1.4. TESTE RÁPIDO DE IMUNOCROMATOLOGRAFIA DE FLUXO LATERAL

##### 1.4.1. Strip Test® GMO TraitCheck™ Leaf (gene *bar* – PAT)

A Imunocromatografia de Fluxo Lateral é um método para detecção de proteínas específicas utilizando anticorpos. O kit imunocromatográfico, usualmente chamados de “tiras de fluxo lateral” (StripTest®), tem grande aplicação na detecção de proteínas expressas em plantas geneticamente modificadas (GM) e que não estão presentes em plantas de cultivares convencionais. As tiras são de fácil utilização e exigem pouco treinamento. O aparecimento de duas linhas coloridas indica um resultado positivo, enquanto apenas a linha superior (controle) colorida indica um resultado negativo. São muito utilizadas para a avaliação de presença adventícia de sementes GM em lotes de sementes de cultivares convencionais. Nesse caso, são avaliadas amostras de tamanho que não pode exceder o limite de sensibilidade do teste, que é maior ou menor em função do nível de expressão da proteína alvo nas plantas GM. Por exemplo, se a sensibilidade do teste é de 1 planta GM em 1.000, cada amostra não pode exceder 1.000 plantas.

Para a realização do teste, cada amostra é macerada em um volume de tampão recomendado pelo fabricante e, após breve agitação e decantação, transfere-se 0,5 mL do sobrenadante para um tubo de microcentrífuga, no qual é colocada a tira. Desta forma, é

utilizada uma tira para cada amostra. Usualmente, após 5-10 minutos é feita a leitura do resultado.

## 1.5. QUANTIFICAÇÃO DE FOLATO TOTAL PELO MÉTODO MICROBIOLOGICO

### 1.5.1. Kit VitaFast® Folic Acid – AOAC ifp

A concentração de vitamina em folhas de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Verônica) foi determinada por meio de ensaios microbiológicos inovadores utilizando o Kit VitaFast® Folic Acid – R-Biopharm, que apresenta um sistema de determinação de folato total disponível, que é rápido e com base em métodos de referência AOAC.

O sistema de placas de microtitulação VitaFast® tem excelentes características de manipulação e desempenho. Ao contrário de outros sistemas de ensaio imunológico, nenhuma etapa de lavagem é necessária. O teste se destaca pela excelente precisão e elevada exatidão. O coeficiente de variação (CV) é inferior a 10%. Todas as etapas do teste e reagentes (microorganismos, meio de cultura e padrão) são ajustados perfeitamente em harmonia uns com os outros. Em comparação com ensaios de vitamina microbiológicos tradicionais, o tempo necessário geralmente para testes de Kit VitaFast® Folic Acid – R-Biopharm é de aproximadamente 60-70% menos, e o consumo de materiais é cerca de 30 vezes menor. Para concluir estes testes microbiológicos podem ser usados para determinar com sucesso o conteúdo de folato natural total em alimentos.

## 2. OBJETIVOS

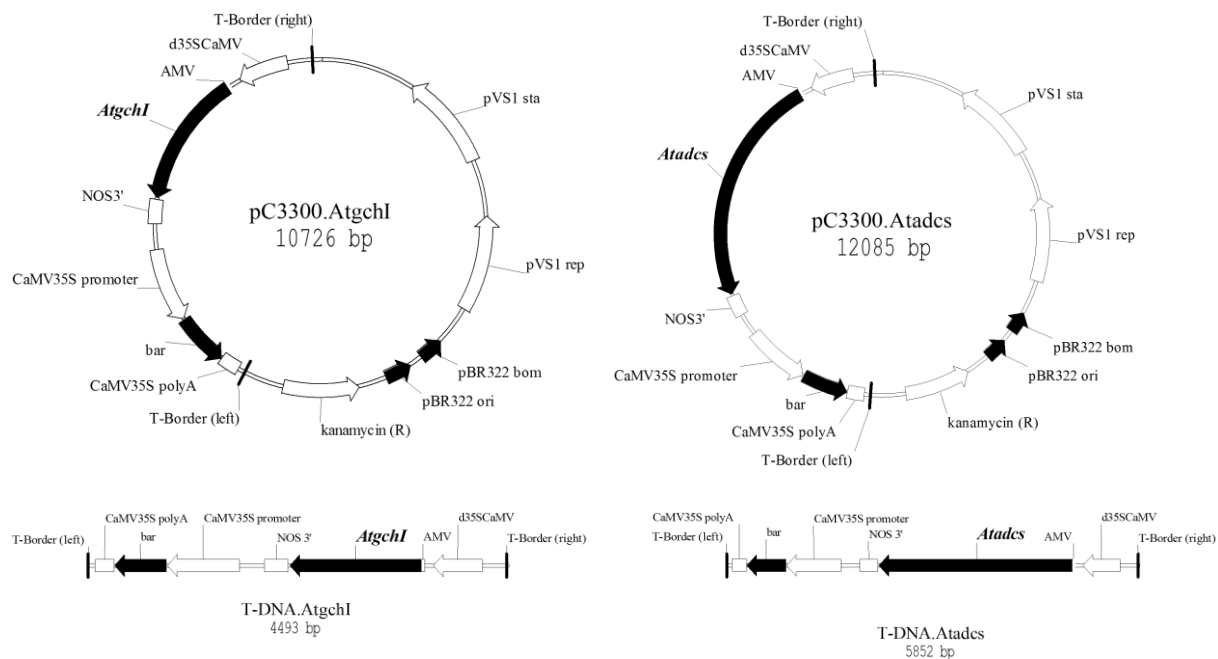
Aumentar o nível de folato total em folhas de plantas de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Verônica) geneticamente modificadas superexpressando duas enzimas precursoras da via metabólica de biossíntese de folato, *GTP ciclohidrolase I (gchI)* e *aminodeoxicorismato sintase (adcs)*, em eventos independentes.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Construção dos vetores de expressão pC.*Atgchl* e pC.*Atadcs*

Os genes que codificam as enzimas *GTP ciclohrolase I* (EC 3.5.4.16) e *aminodeoxisorismato sintase* (EC 2.6.1.85) foram quimicamente sintetizados pela empresa Epoch Biolabs Inc (Sugar Land, TX, USA) de acordo com as sequências da planta *Arabidopsis thaliana* (acesso no GenBank nº. AF489530.1 e NM\_179796.1, respectivamente), sendo denominados *Atgchl* e *Atadcs*.

Em construções independentes, cada gene sintético foi inserido entre os sítios de *NcoI* e *SacI* do vetor pBI426 (Datla et al., 1991), substituindo o gene fusionado *gus:nptII*, sob a orientação do promotor d35SCaMV, do enhancer AMV e do terminador da *nopalina sintase* (T-NOS). Os cassetes de expressão obtidos, |d35SCaMV|AMV|*Atgchl*|NOS3'| e |d35SCaMV|AMV|*Atadcs*|NOS3'|, foram transferidos entre os sítios de *EcoRI* e *HindIII* para o vetor pCAMBIA3300 (CAMBIA, Canberra, Austrália), que contém o gene marcador *nptII* – kanamycin (R) (codifica a enzima *neomicina fosfotransferase II*) e o gene de seleção *bar* (codifica a enzima *fosfinotricina-N-acetiltransferase*), gerando os vetores pC.*Atgchl* e pC.*Atadcs* (Fig. 3).



**Figura 3.** Vetores de transformação pCAtgchl (esquerda) e pCAtadcs; e cassetes de expressão T-DNA.Atgchl e T-DNA.Atadcs.

### 3.2. Transformação genética de alface mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

#### 3.2.1. Materiais

##### 3.2.1.1. Estirpe de *A. tumefaciens*, plasmídeos e genes marcadores

Em eventos independentes, os vetores pC.*Atgchl* e pC.*Atadcs* foram transferidos para linhagens desarmadas de *A. tumefaciens* estirpe EHA 105 (Hood et al., 1993) por eletroporação, que consiste no uso de um pulso elétrico de alta voltagem para criar poros na membrana celular e permitir a entrada do DNA exógeno nas células alvo.

As linhagens transformadas de *A. tumefaciens* contendo os vetores pC.*Atgchl* e pC.*Atadcs* foram armazenadas em glicerol ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) e utilizadas para transformação de explantes de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Verônica) em eventos independentes, de acordo com protocolo estabelecido.

##### 3.2.1.2. Meio de cultura para *A. tumefaciens*

- Meio Luria-Bertani (LB) sólido; meio LB líquido; rifampicina (antibiótico); canamicina (antibiótico).

#### 3.2.1.3. Cultura de tecidos

- Sementes de alface cv. Verônica foram adquiridas da empresa SAKATA
- Esterilizante de superfície: hipoclorito de sódio
- Meio de germinação
- Ácido  $\alpha$ -naftaleno acético (ANA, hormônio)
- 6-benzilaminopurina (BAP, hormônio)
- Cefotaxima (antibiótico)
- Glufosinato de amônio (GA, herbicida)
- Meio de regeneração (LR1)
- Meio de seleção (LR2)
- Meio de enraizamento (LR3)

Todos os meios são esterilizados por tratamento em autoclave (121°C, 20 minutos). As soluções estoque de antibioticos são adicionadas aos meios a temperatura de 50-55°C, após autoclavagem.

#### 3.2.2. Métodos

##### 3.2.2.1. Germinação de sementes

Sementes de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Verônica) foram desinfestadas em fluxo laminar por imersão em uma solução de hipoclorito de sódio (2%) contendo Tween 20 (0,1%) durante 15 minutos com agitação suave. Em seguida, as sementes foram lavadas cinco vezes com água destilada estéril. Em condições assépticas, as sementes foram transferidas para meio de germinação (50 sementes/placa) e colocadas para germinar em sala de crescimento com lâmpadas fluorescente (luz do dia), sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura constante de 25 °C  $\pm$  2 °C, por 2 dias.

#### 3.2.2.2. Preparação da *Agrobacterium*

No 1º dia, em experimentos independentes, linhagens de *A. tumefaciens* transformadas com os vetores pC.*Atgchl* e pC.*Atadcs*, a partir de um estoque de glicerol, foram inoculadas em placas de Petri contendo meio LB sólido e antibióticos. As culturas foram incubadas à 28°C, durante 2 dias. No 3º dia, foram preparados inóculos de culturas que apresentaram colônias individuais, estas foram inoculadas em 30 ml de meio LB líquido contendo antibióticos e incubadas durante a noite a 28°C, com agitação orbital de aproximadamente 200 rpm, até atingirem uma densidade ótica (OD<sub>600</sub>) entre 0,8 e 1,0.

#### 3.2.2.3. Preparação dos explantes

No 4º dia, a partir de plântulas assepticamente germinadas com 48 horas de idade, cuidadosamente foram excisados os cotilédones realizando um corte transversal próximo a radícula sobre papel-filtro estéril e umedecido com água destilada estéril. Foram escolhidos cotilédones de tamanho aproximadamente igual e estes foram utilizados como explantes para a infecção com *A. tumefaciens*.

#### 3.2.2.4. Inoculo da *Agrobacterium*

No 4º dia, assim que a OD<sub>600</sub> da cultura de *Agrobacterium* atingiu 1,0, foram retirados 20 ml da cultura para inoculação dos explantes.

#### 3.2.2.5. Inoculação dos explantes e co-cultivo

No 4º dia, os explantes foram inoculados em cultura de *Agrobacterium* por 10 minutos. Em seguida, os explantes inoculados foram transferidos cuidadosamente para papel-filtro estéril, para eliminar o excesso de inóculo, e transferidos de volta para placas contendo meio de germinação (25 explantes/placa). As placas foram seladas com fita micropore. O co-cultivo dos explantes durou 2 dias, sob temperatura constante de 25 °C ± 2 °C no escuro.

#### 3.2.2.6. Manutenção dos explantes e regeneração de brotos



No 6º dia, os explantes foram lavados em meio contendo MS (sais e vitaminas), 3% de sacarose e 300 mg/L de cefotaxima. Em seguida, os explantes foram transferidos para meio de regeneração (LR1), permanecendo neste durante 7 dias. As trocas para meio fresco (novo) foram realizadas semanalmente. Os explantes em que os calos iniciaram brotações adventícias foram transferidos para meio de crescimento de parte aérea LR2. Após 15 a 40 dias, os explantes que desenvolveram foram colocados em meio de enraizamento LR3, onde permaneceram por 15 a 40 dias.

#### 3.2.2.7. Transferência das plantas para o solo e aclimação

As plântulas que apresentaram potencialmente positivas foram retiradas do frasco cuidadosamente, removendo o meio (LR3) das raízes, utilizando água autoclavada. As plântulas foram transferidas para copos de plástico de 9 cm de diâmetro contendo uma mistura de substrato (50%) e vermiculita (50%). Cada plântula foi protegida por uma saco plástico transparente, formando uma microclima. Os copos foram colocados em bandejas contendo uma lamina d'água e transferidos para estufa (temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas).

Após 21 dias, foi retirado o saco plástico e, em seguida, transplantadas para vasos de plantas contendo adubo (NPK) em solo fértil. Foi aplicado adubo foliar (macro e micronutrientes) em intervalos de 14 dias.

A época de floração foi aguardada, variando de acordo com a época do ano. As sementes foram colhidas aproximadamente 3 a 4 semanas após a antese.

### 3.3. ANÁLISES PARA CONFIRMAÇÃO DA INSERÇÃO DOS TRANSGENES

#### 3.3.1. TESTE RÁPIDO DE IMUNOCROMATOGRAFIA DE FLUXO LATERAL

Para confirmar a atividade da enzima *PAT* em plântulas que se apresentaram tolerantes ao herbicida glufosinato de amônio (GA), amostras de folhas foram coletadas

(aproximadamente 0,5 cm de diâmetro) e testadas com StripTest® GMO TraitCheck™ Leaf (gene bar – PAT) para expressão do gene *bar*.

### 3.3.2. Análise por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para análise por PCR o primeiro passo é a extração de DNA genômico das folhas de alface. O DNA foi isolado de discos foliares de acordo com Doyle & Doyle (1987). Foi empregada a técnica PCR (“Polymerase Chain Reaction”) para a amplificação e confirmação dos transgenes *Atgchl* e *Atadcs*, a partir do DNA genômico extraído das plantas potencialmente transformadas. Para amplificar uma sequência de 583 pb correspondente ao gene *Atgchl*, utilizou-se os iniciadores *Atgchl*.306 e *Atgchl*.889C. Para amplificar uma sequência de 537 pb correspondente ao gene *Atadcs*, utilizou-se os iniciadores *Atadcs*.731 e *Atadcs*.1268C.

### 3.4. Quantificação de folato total pelo método microbiológico

O Kit VitaFast® Folic Acid – AOAC ifp contém uma placa de microtitulação (96 poços) revestida com microrganismos (*Lactobacillus rhamnosus*), um suporte adicional, 3 folhas adesivas, 3 frascos de meio de cultura, 3 frascos de folato padrão, 3 frascos de água esterilizada. O procedimento de teste exige materiais estéreis descartáveis e um fotômetro de placa de microtitulação. Kits VitaFast® Folic Acid são ideais para análise de rotina, uma vez que os reagentes estão prontos o kit é muito fácil de utilizar.

Preparação de amostras de alface para determinação do teor total de folato natural:

- pesou-se exatamente 1 g de amostra (folhas) homogeneizada e 20 mg de pancreatina em um frasco de centrífuga estéril de 50 ml;
- adicionou-se 30 ml de tampão fosfato (0,05 mol/l; ascorbato de 0,1%; pH 7.2), agitou bem e preencheu até 40 ml com tampão fosfato;

- incubou-se 2 horas a 37°C (98,6°F), no escuro (às vezes agitar); depois aqueceu 30 minutos a 95°C (203 ° F) em um banho de água; esfriou rapidamente para 30°C (86°F);
- transferiu-se 1 ml da extração da amostra em um frasco estéril de 1,5 ml e centrifugou 5 minutos (mais de 8.000 x g)

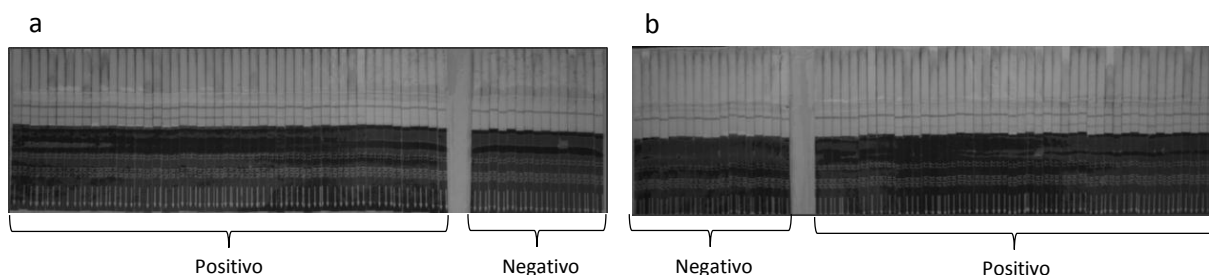
Após a extração de folato total da amostra, cada 150 µl do meio de cultura e do extrato diluído (amostras) foram pipetados em poços de uma placa de microtitulação que é revestida com microorganismos específicos. O crescimento dos microorganismos é dependente de fornecimento de folato. Após a adição do extrato diluído (amostras), as bactérias crescem até que a vitamina seja consumida. A incubação foi realizada no escuro a 37°C (98,6°F) por 44-48 horas. A intensidade do metabolismo ou crescimento em relação a vitamina extraída é medida pela turbidez e comparada com uma curva padrão. A medição foi feita usando um leitor de ELISA de 610-630 nm (alternativamente de 540-550 nm).

#### 4. RESULTADOS

Em 3 experimentos de transformação por *A. tumefaciens*, com 1000 explantes em cada experimento, sendo 500 para o evento pC.*Atgchl* e 500 para o evento pC.*Atadcs*, foram obtidas 37 plantas potencialmente transformadas em regeneração no meio LR2 (desenvolvimento da parte aérea). Estas plantas foram analisadas por Imunocromatografia de fluxo lateral (Strip Test) constatando 5 plantas positivas para expressão do gene *bar* (PAT), sendo 2 plantas positivas para o evento pC.*Atgchl* e 3 plantas positivas para o evento pC.*Atadcs*. Posteriormente, foram confirmadas por PCR, e estas foram aclimatadas e autopolinizadas.

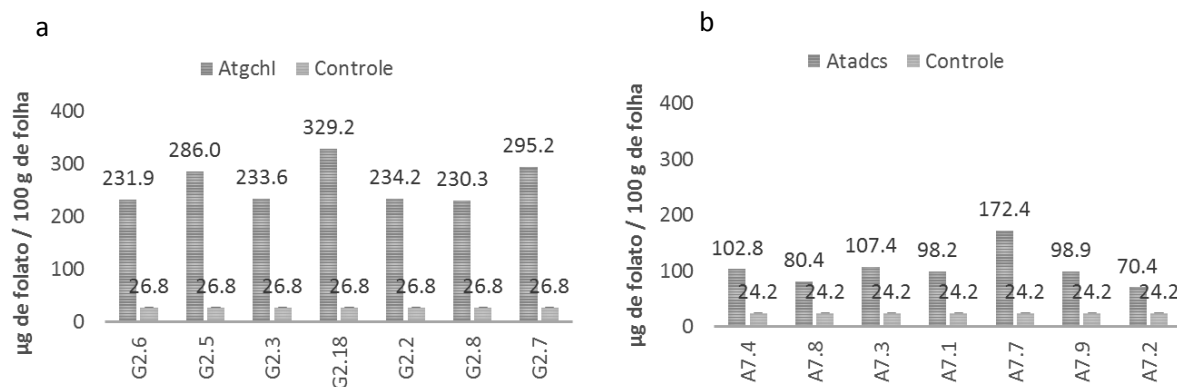
As sementes da geração T<sub>1</sub> foram colhidas, e 60 plantas de cada linhagem foram colocadas para germinar em bandejas com substrato, para avaliação da progênie. As progênies

T<sub>1</sub> das linhagens transformadas apresentaram padrão mendeliano de segregação de um gene dominante simples tanto para *Atgchl* e *Atadcs*, quanto para o gene *bar* (PAT) (Fig. 4).



**Figura 4.** Segregação mendeliana das plantas GM observada através de análise imunocromatográfica de fluxo lateral em folhas cotilédones de plantas expressando a proteína PAT/gene *bar*. (a) GCHI.2 (*Atgchl*) e (b) ADCS.7 (*Atadcs*).

Foram realizadas análises para quantificação de folatos totais em 7 indivíduos positivos de cada linhagem GM, escolhidos ao acaso. Observou-se 1 linhagem do evento pC.*Atgchl* com 15 vezes mais folato e 1 linhagem do evento pC.*Atadcs* com 7 vezes mais folato, quando comparadas a plantas não transformadas. Estes indivíduos foram identificados como GCHI.2.18 e ADCS.7.7 (Fig. 5).



**Figura 5.** Quantificação de folato total em plantas de alface GM geração T<sub>1</sub> e de plantas não GM (controle). (a) Teor total de folato em plantas superexpressando *Atgchl*. (b) Teor total de folato em plantas superexpressando *Atadcs*.

O nível máximo de melhoramento nutricional (biofortificação) de folato obtido nas folhas de alface foi de 329,2 µg/100 g de peso fresco, o que representa 15 vezes mais folato do que o observado em folhas verdes de alface cv. Verônica não transformada. Com estes resultados plantas de alface biofortificadas para aumento de 15 vezes no teor de folato total

obtidas neste trabalho fornecerão 70% IDR para adultos (400 µg/dia para um adulto) pela ingestão diária de uma porção regular (50 g de folhas, de acordo com USDA) de folhas de alface GM.

## 5. CONCLUSÕES

Embora programas de fortificação e suplementação de ácido fólico (ingestão de cápsula) mostraram-se eficientes até certo ponto nos países desenvolvidos, estes provavelmente não são as opções mais eficazes para muitos países em desenvolvimento, devido a situações políticas e econômicas instáveis. Melhoria do nível de folato em culturas pela biotecnologia (biofortificação) fornece uma alternativa racional, ou, pelo menos, uma solução complementar, para enfrentar a desnutrição de folato.

Recentes progressos em nossa compreensão do metabolismo do folato em plantas levaram ao desenvolvimento de estratégias de engenharia metabólica. Conceitualmente, existem vários meios possíveis para melhorar o teor de folato em plantas por meio de engenharia, incluindo a superexpressão de outras enzimas nas etapas da síntese THF ou estratégias que favoreçam a estabilização de folatos, por exemplo, através da produção de uma proteína de ligação de folato.

Embora outras atividades da via biossintética THF limitam a acumulação de folato nestas plantas transgênicas, o sucesso da estratégia de superexpressar as enzimas *GTP ciclohidrolase I* (*gchI*) e *aminodeoxicorismato sintase* (*adcs*) via engenharia genética foi estabelecido e abre portas para a biofortificação de folato em uma grande variedade de culturas agrícolas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bailey, L. B. and Gregory, J. F., 3rd (1999). Folate metabolism and requirements. *The Journal of Nutrition* 129, 779–782.

Basset, G. J., Quinlivan, E. P., Ravanel, S., Rébeillé, F., Nichols, B. P., Shinozaki, K., Seki, M., Adams-Phillips, L. C., Giovannoni, J. J., Gregory, J. F., 3rd and Hanson, A. D. (2004). Folate synthesis in plants: The p-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 1496–1501.

Basset, G., Quinlivan, E. P., Ziemak, M. J., Diaz De La Garza, R., Fischer, M., Schiffmann, S., Bacher, A., Gregory, J. F., 3rd and Hanson, A. D. (2002). Folate synthesis in plants: The first step of the pterin branch is mediated by a unique bimodular GTP cyclohydrolase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 12489–12494.

Brasileiro, A. C. M.; Carneiro V. T. C. eds 1998. *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Brasília, Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen.

Brasileiro, A.C.M.; Lacorte, C. *Agrobacterium: um sistema natural de transferencia de genes para plantas*. *Biotecnologia Ciencia e Desenvolvimento*, v.3, n.15, p.12-15, jul./ago.2000.

Camara, D., Richefeu-Contesto, C., Gambonnet, B., Dumas, R. and Rébeillé, F. (2011). The synthesis of pABA: Coupling between the glutamine amidotransferase and aminodeoxychorismate synthase domains of the bifunctional aminodeoxychorismate synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 505, 83–90.

Chan, S. Y. and Cossins, E. A. (2003). The intracellular distribution of folate derivatives in pea leaves. *Pteridines* 14, 17–26.

- Chilton MD, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11: 263–271.
- Choi, S. W. and Mason, J. B. (2000). Folate and carcinogenesis: An integrated scheme. *The Journal of Nutrition* 130, 129–132.
- Cossins, E. A. (2000). The fascinating world of folate and one-carbon metabolism. *Canadian Journal of Botany* 78, 691–708.
- Cossins, E. A. and Chen, L. (1997). Foliates and one-carbon metabolism in plants and fungi. *Phytochemistry* 45, 437–452.
- De Bree, A., van Dusseldorp, M., Brouwer, I. A., van het Hof, K. H. and SteegersTheunissen, R. P. (1997). Folate intake in Europe: Recommended, actual and desired intake. *European Journal of Clinical Nutrition* 51, 643–660.
- De Wals, P., Tairou, F., Van Allen, M. I., Uh, S. H., Lowry, R. B., Sibbald, B., Evans, J. A., Van den Hof, M. C., Zimmer, P., Crowley, M., Fernandez, B. Lee, N. S. et al. (2007). Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. *The New England Journal of Medicine* 357, 135–142.
- DellaPenna D, Pogson B (2006) *Annu Rev Plant Biol* 57:711–738.
- Diaz de la Garza, R. I., Gregory, J. F., 3rd and Hanson, A. D. (2007). Folate biofortification of tomato fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 4218–4222.
- Diaz de la Garza, R., Quinlivan, E. P., Klaus, S. M., Basset, G. J., Gregory, J. F., 3rd and Hanson, A. D. (2004). Folate biofortification in tomatoes by engineering the pteridine branch

of folate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13720–13725.

Douce, R. and Neuburger, M. (1999). Biochemical dissection of photorespiration. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 214–222.

Eichholzer, M., Tonz, T. and Zimmermann, R. (2006). Folic acid: A public-health challenge. *The Lancet* 367, 1352–1361.

Filgueira, F. A. R. *Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. Viçosa, MG: UFV. 2008. 421 p.

Food and Nutritional Board (1998). *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. Institute of Medicine, US National Academy of Sciences, Washington D.C.

Geisel, J. (2003). Folic acid and neural tube defects in pregnancy: A review. *The Journal of Perinatal & Neonatal Nursing* 17, 268–279.

Goyer, A., Illarionova, V., Roje, S., Fischer, M., Bacher, A. and Hanson, A. D. (2004). Folate biosynthesis in higher plants. cDNA cloning, heterologous expression, and characterization of dihydroneopterin aldolases. *Plant Physiology* 135, 103–111.

Jabrin, S., Ravanel, S., Gambonnet, B., Douce, R. and Rebeille, F. (2003). One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. *Plant Physiology* 131, 1431–1439.

Klaus, S. M., Wegkamp, A., Sybesma, W., Hugenholtz, J., Gregory, J. F., 3rd and Hanson, A. D. (2005a). A nudix enzyme removes pyrophosphate from dihydroneopterin triphosphate in the folate synthesis pathway of bacteria and plants. *Journal of Biological Chemistry* 280, 5274–5280.



Loizeau, K., De Brouwer, V., Gambonnet, B., Yu, A., Renou, J. P., Van Der Straeten, D., Lambert, W. E., Rébeillé, F. and Ravanel, S. (2008). A genome-wide and metabolic analysis determined the adaptive response of *Arabidopsis* cells to folate depletion induced by methotrexate. *Plant Physiology* 148, 2083–2095.

Loizeau, K., Gambonnet, B., Zhang, G. F., Curien, G., Jabrin, S., Van Der Straeten, D., Lambert, W. E., Rébeillé, F. and Ravanel, S. (2007). Regulation of one-carbon metabolism in *Arabidopsis*: The N-terminal regulatory domain of cystathionine gamma-synthase is cleaved in response to folate starvation. *Plant Physiology* 145, 491–503.

Mark Lucock. Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes *Molecular Genetics and Metabolism*, Volume 71, Issues 1–2, September 2000, Pages 121–138.

Mattson, M. P. and Shea, T. B. (2003). Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosciences* 26, 137–146.

Mouillon, J. M., Ravanel, S., Douce, R. and Rébeillé, F. (2002). Folate synthesis in higher-plant mitochondria: Coupling between the dihydropterin pyrophosphokinase and the dihydropteroate synthase activities. *The Biochemical Journal* 363, 313–319.

Mouillon, J. M., Ravanel, S., Douce, R. and Rébeillé, F. (2002). Folate synthesis in higher-plant mitochondria: Coupling between the dihydropterin pyrophosphokinase and the dihydropteroate synthase activities. *The Biochemical Journal* 363, 313–319.

Orsomando, G., de la Garza, R. D., Green, B. J., Peng, M., Rea, P. A., Ryan, T. J., Gregory, J. F., 3rd and Hanson, A. D. (2005). Plant gamma-glutamyl hydrolases and folate polyglutamates: Characterization, compartmentation, and co-occurrence in vacuoles. *Journal of Biological Chemistry* 280, 28877–28884.

- Ravanel, S., Cherest, H., Jabrin, S., Grunwald, D., Surdin-Kerjan, Y., Douce, R. and Rébeillé, F. (2001). Tetrahydrofolate biosynthesis in plants: Molecular and functional characterization of dihydrofolate synthetase and three isoforms of folylpolyglutamate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 15360–15365.
- Rébeillé, F., Macherel, D., Mouillon, J. M., Garin, J. and Douce, R. (1997). Folate biosynthesis in higher plants: Purification and molecular cloning of a bifunctional 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase/7,8dihydropteroate synthase localized in mitochondria. *The EMBO Journal* 16, 947–957.
- Rébeillé, F., Neuburger, M. and Douce, R. (1994). Interaction between glycine decarboxylase, serine hydroxymethyltransferase and tetrahydrofolate polyglutamates in pea leaf mitochondria. *The Biochemical Journal* 302, 223–228.
- Rébeillé, F., Ravanel, S., Jabrin, S., Douce, R., Storozhenko, S. and Van Der Straeten, D. (2006). Folates in plants: Biosynthesis, distribution, and enhancement. *Physiologia Plantarum* 126, 330–342.
- Rush D (2000) *Am J Clin Nutr* 72:212S– 240S.
- Ryder EJ (1986) Lettuce breeding. In: Basset MJ (ed.) *Breeding vegetable crops*. AVI Publishing, Westport, pp. 433-474.
- Ryder EJ (1999) *Crop production science in horticulture. Lettuce, endive and chicory*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 8-11.
- Ryder, E.J. 2002. A mild systemic reaction to lettuce mosaic virus in lettuce: Inheritance and interaction with an allele for resistance. *J. Amer. Hort. Sci.* 127:814-818.

- Schnell, J. R., Dyson, H. J. and Wright, P. E. (2004). Structure, dynamics, and catalytic function of dihydrofolate reductase. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 33, 119–140.
- Scott, J., Rébeille, F. and Fletcher, J. (2000). Folic acid and folates: The feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 795–824.
- Shane, B. (1989). Polyglutamate synthesis and role in the regulation of one-carbon metabolism. *Vitamins and Hormones* 45, 263–335.
- Stéphane Ravanel, Roland Douce, Fabrice Rébeillé, Chapter 3 - Metabolism of Folates in Plants, In: Fabrice Rébeillé and Roland Douce, Editor(s), *Advances in Botanical Research*, Academic Press, 2011, Volume 59, Pages 67-106
- Stevens, M.A. 1974. Varietal influence on nutritional value. In: P.L. White and N. Selvey (eds.), *Nutritional qualities of fresh fruits and vegetables*. Futura Publications, Mt. Kisco, NY.
- Stokstad E L R (1979) Early work with folic acid. *Fed. Proc.* 38:2696–2698.
- Stover, P. J. (2004). Physiology of folate and vitamin B-12 in health and disease. *Nutrition Reviews* 62, S3–S12.
- Van Wilder, V., De Brouwer, V., Loizeau, K., Gambonnet, B., Albrieux, C., Van Der Straeten, D., Lambert, W. E., Douce, R., Block, M. A., Rébeille, F. and Ravanel, S. (2009). C1 metabolism and chlorophyll synthesis: The Mg-protoporphyrin IX methyltransferase activity is dependent on the folate status. *The New Phytologist* 182, 137–145.
- Vries IM de (1997) Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. *Genet Res Crop Evol* 171:233-248.

Wills L (1931). Treatment of 'pernicious anaemia of pregnancy' and 'tropical anaemia' with special reference to yeast extract as curative agent. *British Medical Journal* 1:1059-1064.

Zambryski PC (1992) Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 465–490.